EVALUACIÓN DE BIOAEROSOLES, BACTERIAS Y HONGOS, EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA - BIOTECNOLOGÍA DE LA ESPE Y CONSTRUCCIÓN PREVIA DE UN MUESTREADOR DE BURBUJEO EXPERIMENTAL

Koch Alma, Romero Pedro, López M. Andrés

Laboratorio de Microbiología – Biotecnología
Departamento de Ciencias de la Vida
Escuela Politécnica del Ejército
almakoch@yahoo.com.mx

RESUMEN

Se investigó la calidad del aire interior en las áreas de Investigaciones, Docencia y Biología Molecular del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la ESPE – Ecuador. Los elementos detectados fueron los bioaerosoles, bacterias y hongos, de acuerdo a la norma *NIOSH 0800 Bioaerosols Sampling*. Para este propósito se construyó y utilizó un muestreador de burbujeo experimental diseñado por Agranovski et al. (2002) basado en un novedoso método de remoción de partículas del aire, con ciertas modificaciones. El procesamiento e identificación de las muestras se realizó mediante técnicas de Microbiología tradicional y el uso del software gratuito Identax Bacterial Identification System. La mayor cantidad de bioaerosoles fue encontrada en el área de Biología Molecular y la menor en el área de Investigaciones. En el área de Investigaciones las concentraciones promedio de bioaerosoles bacterias y hongos fueron de $6{,}775 \times 10^{7}$ UFC/m^3, las de bacterias $1{,}355 \times 10^{8}$ UFC/m^3 y las de hongos 0 UFC/m^3; en el área de Docencia las bacterias y hongos permanecieron en $7{,}792 \times 10^{8}$ UFC/m^3, las de bacterias en $8{,}402 \times 10^{8}$ UFC/m^3 y las de hongos en $3{,}712 \times 10^{4}$ UFC/m^3; en el área de Biología Molecular las bacterias y hongos estuvieron en $1{,}197 \times 10^{9}$ UFC/m^3, las de bacterias en $2{,}394 \times 10^{9}$ UFC/m^3 y las de hongos en 0 UFC/m^3. Prácticamente todas las concentraciones de bioaerosoles excedieron los límites sugeridos por la *Unión Europea*, la *Organización Mundial de la Salud* y *Holanda*. Se aislaron y caracterizaron 42 microorganismos que incluían 21 tipos distintos de bacterias y 1 tipo de hongo filamentoso. Las bacterias Gram negativas predominaron sobre las Gram positivas. Los géneros determinados fueron *Enterobacter, Yersinia*, *Serratia*, *Ewingella*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Hafnia*, *Bacillus* y *Alternaria spp*.

Recibido: Enero de 2014
Aceptado: Marzo de 2014

ABSTRACT

It was investigated the indoor air quality in the areas of Research, Teaching and Molecular Biology of the Laboratory of Microbiology - Biotechnology from ESPE - Ecuador. The elements detected were bio aerosols, bacteria and fungi, according to *NIOSH 0800 Bio aerosols Sampling* standard. For this purpose we constructed and used an experimental bubbling sampler designed by Agranovski et al. (2002) based on a novel method for removing particles from the air, with some modifications. The processing and identification of samples were performed using traditional microbiology techniques and the use of free software Identax Bacterial Identification System.

Most bio aerosols were found in the Molecular Biology area and the lowest in the Research area. The mean concentrations of bio aerosols bacteria and fungi in the area of Research were $6,775x10^7$ UFC/m^3 (bacteria: $1,355x10^8$ UFC/m^3 and fugi: 0 UFC/$m^{3)}$. In the Teaching Lab, bacteria and fungi remained in $7,792x10^8$ UFC/m^3 (bacteria: $8,402x10^8$ UFC/m^3 and fungi: $3,712x10^4$ UFC/m^3); and, in Molecular Biology, bacteria and fungi stood in $1,197x10^9$ UFC/m^3 (bacteria: $2,394x10^9$ UFC/m^3 and fungi: 0 UFC/m^3). Virtually all bioaerosol concentrations exceeded the limits suggested by the *European Union*, the *World Health Organization* and *Netherlands*. We isolated and characterized 42 microorganisms including 21 different types of bacteria and 1 type of filamentous fungi. Gram negative bacteria predominated over Gram positive. The genera determined were *Enterobacter, Yersinia*, *Serratia*, *Ewingella*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Hafnia*, *Bacillus* and *Alternaria spp*.

1 INTRODUCCIÓN

La *contaminación atmosférica* se define como la presencia de ciertas substancias y/o formas de energía en el aire, en concentraciones, niveles o permanencia lo suficientemente altos como para constituir un riesgo a la salud y a la calidad de vida de la población, y a la preservación de la naturaleza o a la conservación del patrimonio ambiental (Zaror, 2000). Las concentraciones de aerosoles están asociadas principalmente con las fuentes de emisión en interiores y en exteriores, ya sean de origen natural o antropogénico. Los contaminantes atmosféricos más importantes son el dióxido de carbono y el monóxido de carbono (CO_2, CO), compuestos orgánicos volátiles no metano (NMVOCs), metano (CH_4), óxidos de nitrógeno (NOx, N_2O), amoníaco (NH_3), dióxido de azufre (SO_2), material particulado (PM), los metales pesados (HM) y contaminantes orgánicos persistentes (POPs) (Lazaridis & Colbeck, 2010). Los contaminantes biológicos del aire están representados por los bioaerosoles, alérgenos o microbiológicos; contaminantes químicos, material particulado suspendido respirable (RSPM) es decir, PM_{10}, $PM_{2.5}$ y $PM_{1.0}$; material sedimentable; gases (CO_2, CO, SOx, NOx, O_3) y compuestos orgánicos volátiles (VOCs), incluyendo formaldehído (Goyal & Khare, 2011).

Los *Bioaerosoles* se definen como partículas de tamaño microscópico suspendidas en el aire, de origen biológico que pueden afectar a los seres humanos, causándoles algún tipo de alergia, toxicidad o infección. Pueden estar constituidos por virus, bacterias, esporas, polen y, en general, cualquier resto de microorganismos (Sánchez-Monedero, Roig, Cayuela, & Stentiford, 2006). Registran una gran variedad de tamaños, los virus tienen un rango entre 0,015 y 0,045 µm, las bacterias varían entre 0,3 y 10 µm, las esporas de hongos van desde 1,0 hasta 100 µm, el polen está entre 3,5 y >200 µm (Tilley, 1997) y los mohos se encuentran entre 2 y 200 µm (Goyer, Levoie, Lazure, & Marchand, 2001). Entre los bioaerosoles están inmersos los *bio alérgenos* que son potentes en su acción e incluyen enzimas derivadas de hongos y bacterias producidas por compañías de biotecnología, polen de plantas (Srikanth, Sudharsanam, & Steinberg, 2008), polvo orgánico, endotoxinas y micotoxinas, excrementos o partes de insectos, escamas de piel, pelo (Dietrich, 2009), entre otros.

Los bioaerosoles se originan en cualquier superficie natural o artificial, y cada fuente da lugar a una colección totalmente única de este material biológico del aire (Srikanth, Sudharsanam, & Steinberg, 2008). Se transportan a menudo unidos a otras partículas, tales como escamas de piel, tierra, polvo, saliva o gotitas de agua (Ahmad Nasir & Colbeck, 2010) y las principales vías de exposición para el ser humano a los bioaerosoles son esencialmente inhalación, ingestión y contacto con la piel, pero la inhalación es la que da lugar a los mayores problemas para la salud (Sánchez-Monedero, Roig, Cayuela, & Stentiford, 2006).

La cantidad de partículas biológicas en suspensión en el aire se ve afectada principalmente por la localización, factores temporales, variables atmosféricas y constituyentes atmosféricos (Tilley, 1997). Los bioaerosoles, una vez que se encuentran en suspensión, tienen un comportamiento aerodinámico que va a estar gobernado por sus propiedades físicas: forma, tamaño y densidad (Vélez & Camargo, 2008), y las condiciones medioambientales: corrientes de aire, humedad y temperatura (Sánchez-Monedero, Roig, Cayuela, & Stentiford, 2006).

Los principales métodos de muestreo de bioaerosoles se basan en técnicas de burbujeo en líquidos, retención en superficies sólidas, sedimentación, filtración, precipitación electrostática y precipitación térmica (Goyer, Levoie, Lazure, & Marchand, 2001). Los métodos de análisis de los bioaerosoles implican tanto el cultivo de los microorganismos en medios pre-seleccionados como exámenes mediante técnicas que omiten el cultivo (Cartwright, Horrocks, Kirton, & Crook, 2009). Los métodos actuales se han aplicado tanto a nivel molecular y no molecular (ADN o ARN) y microarrays, entre otros. Además, se han introducido técnicas espectroscópicas basadas por ejemplo en la masa de biomoléculas fragmentadas, en vibraciones moleculares de los enlaces químicos de las biomoléculas, o en la fluorescencia de constituyentes celulares, todo en combinación con el análisis de datos quimiométricos (Mandal & Brandl, 2011). Aunque los costos de preparación pueden ser altos, un sistema establecido podría ser un método de monitoreo simple y rentable (Cartwright, Horrocks, Kirton, & Crook, 2009).

La evaluación de bioaerosoles persigue determinar la concentración de estos agentes contaminantes en un ambiente, verificar y medir su presencia en el aire y en la mayoría de los casos no existe un método de muestreo simple que se puede recoger, identificar y cuantificar todos los componentes existentes en un entorno particular (Srikanth, Sudharsanam, & Steinberg, 2008). En este estudio se evaluaron los bioaerosoles (bacterias y hongos) en el Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la ESPE y se construyó previamente un muestreador de burbujeo experimental de acuerdo al diseño de Agranovski et al. (2002) basado en un novedoso método de remoción de partículas del aire, con ciertas modificaciones.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Zona de estudio

La investigación, en la que están inmersos el trabajo de campo y el análisis de laboratorio, fue realizada en el Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, Ecuador, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, con la colaboración del Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI) de la ESPE. El laboratorio está conformado por tres zonas: 1. Área de Investigaciones (Área A), tiene un área aproximada de 30,16 m^2 y la ubicación en coordenadas UTM es 17N 0784437 UTM 9965386; 2. Área de Docencia (Área B), cuenta con un área aproximada de 53,65 m^2 y la ubicación en coordenadas UTM es 17N 0784440 UTM 9965344; 3. Área de Biología Molecular (Área C), posee un área aproximada de 46,34 m^2 y la ubicación en coordenadas UTM es 17N 0784475 UTM 9965394.

2.2 Investigación de campo

2.2.1 Evaluación del entorno de trabajo

Se efectuó una inspección detallada de las áreas de estudio y se verificaron los tres elementos que promueven el crecimiento microbiano en un ambiente interior: una fuente microbiana, los nutrientes y el agua (Goyer, Levoie, Lazure, & Marchand, 2001). Se ejecutaron una inspección exterior y otra interior de los edificios; en la primera se revisaron las columnas a la vista lo que permitió evaluar la presencia o ausencia de grietas e infiltraciones en las estructuras; y en la segunda se analizó alrededor de las ventanas, puertas, conductos de tuberías, enchufes eléctricos, instalaciones de luz, uniones de las estructuras, muros, pisos, papel, cartón, entre otros.

Por último se desarrolló un detalle de actividades del área de trabajo donde se registraron las labores cumplidas por el personal en el entorno de trabajo durante la evaluación de los bioaerosoles.

2.2.2 Tipos de bioaerosoles a muestrear

Los bioaerosoles que se investigaron en este estudio son bacterias y hongos, de conformidad a lo que se expresa en la norma *NIOSH 0800 Bioaerosol Sampling* (NIOSH, 1998), con modificaciones de acuerdo a los equipos y técnicas de análisis empleados.

2.2.3 Puntos de muestreo

En este estudio se emplearon dos puntos de muestreo por cada área del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología debido al diseño del experimento.

2.2.4 Número de muestras

En esta investigación se realizaron tres muestreos durante tres días consecutivos representativos (un muestreo por día) por área del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología, con análisis por duplicado (dos puntos de muestreo).

2.2.5 Tiempo y flujo de muestreo

El tiempo de muestreo de la investigación de bioaerosoles, bacterias y hongos, fue de 8 h continuas diarias utilizando un flujo de succión de aire de 4 L/min (Agranovski, Agranovski, Reponen, Willeke, & Grinshpun, 2002) medido mediante un rotámetro. El volumen de aire muestreado cada día de la evaluación, en cada área del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología, fue de 1920 L (1.920 m^3).

2.2.6 Temperatura, humedad relativa y presión atmosférica

Se registraron los valores de temperatura, humedad relativa y presión atmosférica durante la evaluación de bioaerosoles en el laboratorio mediante un termohigrómetro.

2.2.7 Muestreo de bioaerosoles

Un novedoso muestreador para recolectar bioaerosoles ha sido desarrollado por Agranovski et al. (2002), denominado por el autor como “Bubbler”.

En este estudio se lo utilizó debido a que presenta características innovadoras: tamaño compacto, bajo costo de construcción, empleo de bajos caudales de succión de aire, identificación específica de partículas, mantenimiento de altas eficiencias físicas y biológicas en periodos largos, y el uso de un nuevo método de remoción eficiente de partículas provenientes de gases mediante burbujas(figura 1). El muestreador Bubbler ha sido empleado para recolectar diversos bioaerosoles: bacterias y hongos (Agranovski, Agranovski, Reponen, Willeke, & Grinshpun, 2002) y virus (Agranovski, y otros, 2005).

2.2.8 Configuración del muestreador experimental

Un diagrama esquemático del nuevo muestreador se muestra en la figura 1. El dispositivo prototipo consta de dos medios cilindros coaxiales: el que está en el interior tiene un diámetro interno de 45 mm con el medio poroso colocado en la parte inferior, el que está en el exterior tiene 75 mm de diámetro externo. Ambos están unidos el uno al otro por la parte superior y trasera (Agranovski, Agranovski, Reponen, Willeke, & Grinshpun, 2002).

El muestreador prototipo (dimensiones: altura = 110 mm, diámetro = 75 mm, espesor de pared = 2 mm) está hecho de plástico PVC (polivinil cloruro). Se coloca un medio fibroso de polipropileno (diámetro de la fibra = 12 µm, la densidad de empaquetamiento = 16%, espesor = 6 mm), 15 mm por encima de la parte inferior del dispositivo, sellado a la parte inferior de la caja interior (Agranovski, Agranovski, Reponen, Willeke, & Grinshpun, 2002). El medio poroso está asegurado por una tuerca en la parte inferior de la carcasa interior (Agranovski, y otros, 2005).

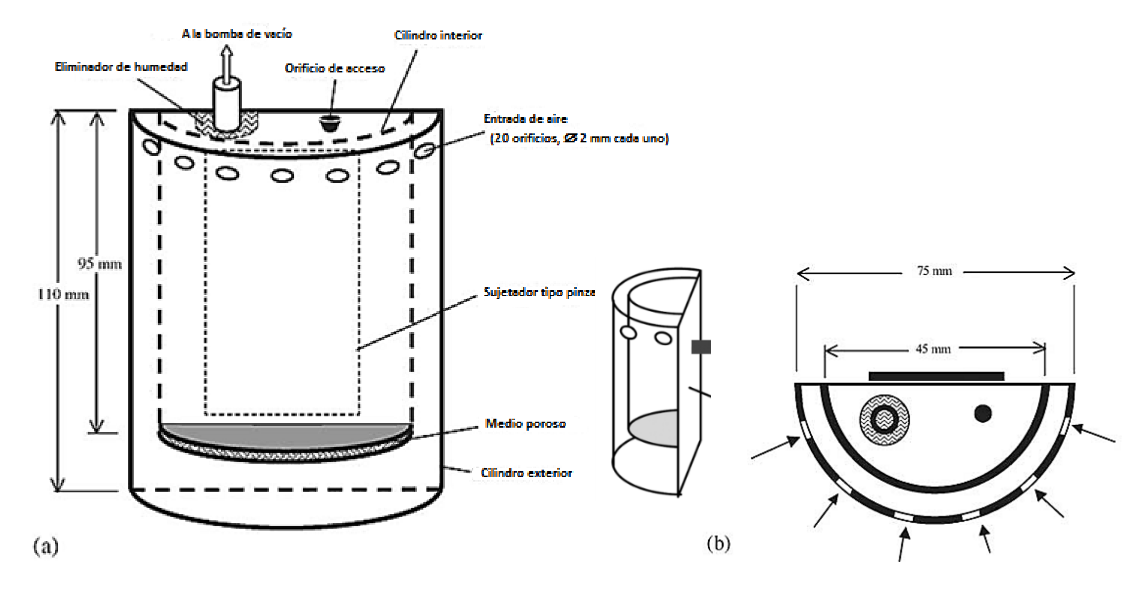


Figura 1. Esquema del muestreador: (a) vista lateral y vista tridimensional, y (b) vista de planta (Agranovski, Agranovski, Reponen, Willeke, & Grinshpun, 2002).

Antes del muestreo, se añade 40 mL de fluido de recolección (agua esterilizada) al muestreador a través de un orificio de acceso de 8 mm de diámetro que está sellado durante el muestreo. El aire entra en el dispositivo a través de 20 orificios de entrada de aire, 2 mm de diámetro cada uno, situados a 5 mm desde la parte superior de la caja externa, y se mueve hacia abajo entre los dos medios cilindros. Esta disposición periférica de los orificios de entrada permite al aire ingresar en un ángulo de 180° (Agranovski, Agranovski, Reponen, Willeke, & Grinshpun, 2002).

2.2.9 Aplicación del muestreador experimental en la investigación

En esta investigación se construyó y utilizó el muestreador experimental “Bubbler” desarrollado por Agranovski *et al.* (2002) para tomar muestras de bioaerosoles, bacterias y hongos, en el Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la ESPE. Se construyó el equipo muestreador (figura 2) de acuerdo a las especificaciones descritas por el autor, a excepción del material de fabricación que fue de acrílico debido a su bajo costo, en lugar de PVC. Para este estudio se emplearon dos prototipos para muestras (B1 y B2) y uno como blanco (B3). En relación al uso, se cambió el fluido de recolección, de agua esterilizada a caldo BD Tripticase Soy Broth (TSB), para asegurar la viabilidad de los bioaerosoles muestreados. El volumen del fluido de recolección fue de 40 mL, el flujo de muestreo fue de 4 L/min fue succionado por dos bombas de vacío para cada muestreador y el tiempo de muestreo fue de 8 h.



Figura 2. Equipo muestreador (Agranovski et al., 2002) construido para la Evaluación de Bioaerosoles, bacterias y hongos (López M., 2012).

2.2.10 Limpieza y desinfección del equipo muestreador

Se limpiaron y desinfectaron los dispositivos muestreadores antes y después del muestreo de bioaerosoles (figura 3). La limpieza se realizó mediante el empleo de hisopos de algodón impregnados de alcohol comercial de 70% de pureza (Prescott, Harley, & Klien, 2008) sobre las paredes interiores del equipo, en los cilindros interiores, exteriores y en los filtros de polipropileno. Además, se ensayó una prueba de verificación de contaminación de los equipos.

La desinfección de los equipos muestreadores mediante radiación ultravioleta (Prescott, Harley, & Klien, 2008) se efectuó después de la limpieza, abriendo los equipos dentro de la cámara de radiación UV durante una hora para que la exposición sea directa. Al finalizar la limpieza y desinfección, se sellaron los orificios de los equipos con cinta aislante y de esta forma quedaron listos para la siguiente etapa de la evaluación de bioaerosoles.

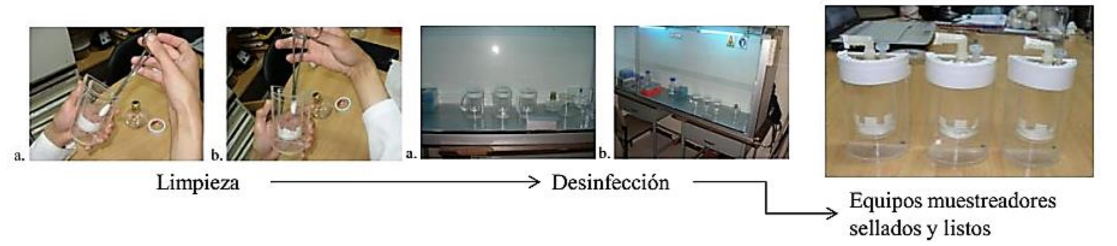


Figura 3. Esquema de la limpieza y desinfección de los equipos muestreadores para la Evaluación de Bioaerosoles, bacterias y hongos (López M., 2012).

2.2.11 Preparación de los equipos muestreadores

Después de la limpieza y la desinfección de los equipos muestreadores, se colocaron 40 mL del medio TSB mediante un dosificador a través del orificio de acceso de los dispositivos y se cerraron los accesos de los muestreadores (figura 4).



Figura 4. Esquema de la preparación de los equipos muestreadores para la Evaluación de Bioaerosoles, bacterias y hongos (López M., 2012).

2.2.12 Uso del equipo muestreador *In situ*

A continuación se posicionaron los equipos en los puntos de muestreo de cada área del laboratorio (figuras 5, 6, 7), luego se quitaron las cintas aislantes de los orificios de los dispositivos prototipos, se conectaron las mangueras de succión de aire acopladas a las bombas de vacío y se inició el muestreo de bioaerosoles. El flujo de muestreo del aire fue de 4 L/min y el periodo de muestreo fue de 8 h diarias.

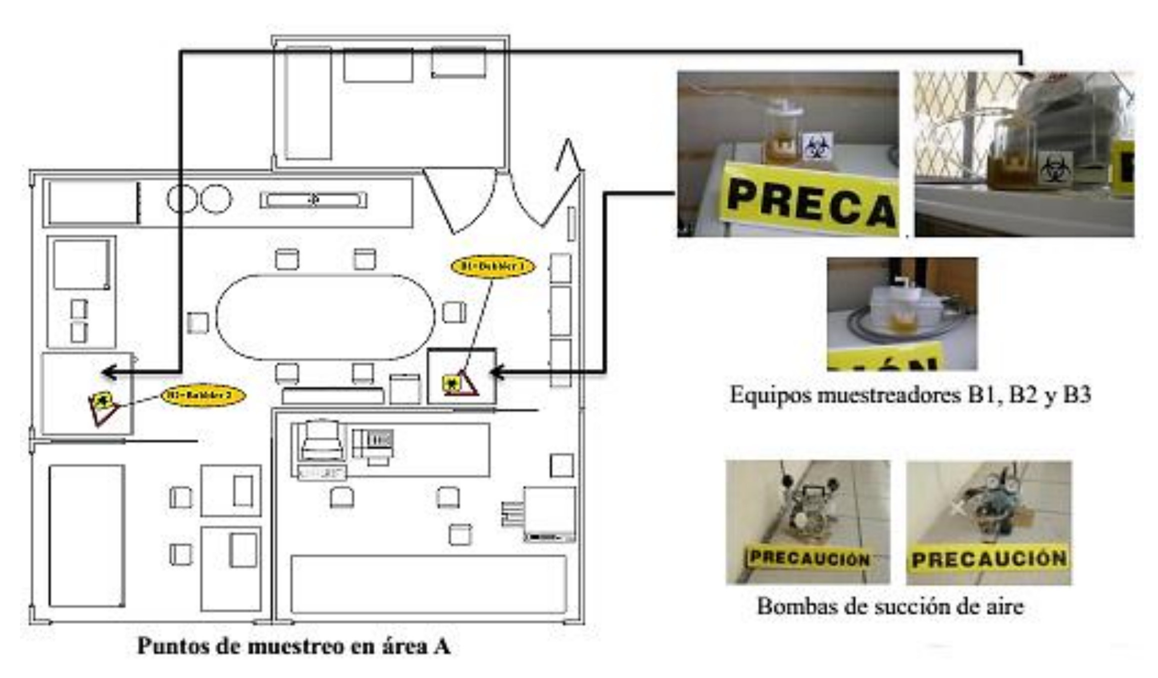


Figura 5. Muestreo *In situ* en el área de Investigaciones (diagrama), se visualizan los puntos de muestreo B1 y B2, los dispositivos de captación de bioaerosoles y las bombas de succión de aire (López M., 2012).

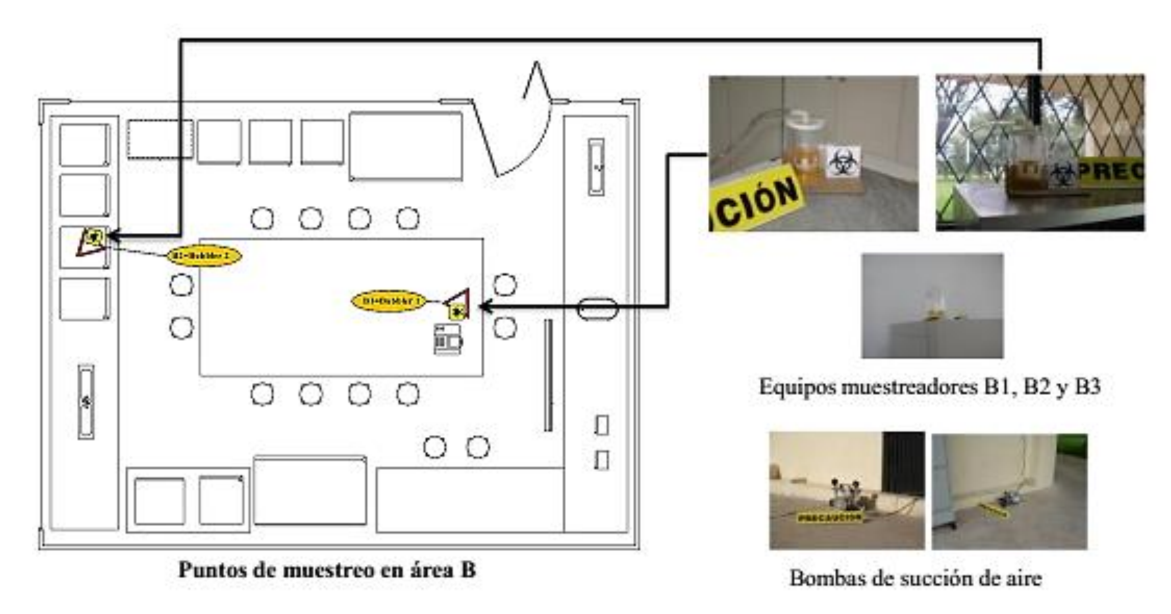


Figura 6. Muestreo *In situ* en el área de Docencia (diagrama), se aprecian los puntos de muestreo B1 y B2, los dispositivos de captación de bioaerosoles y las bombas de succión de aire (López M., 2012).

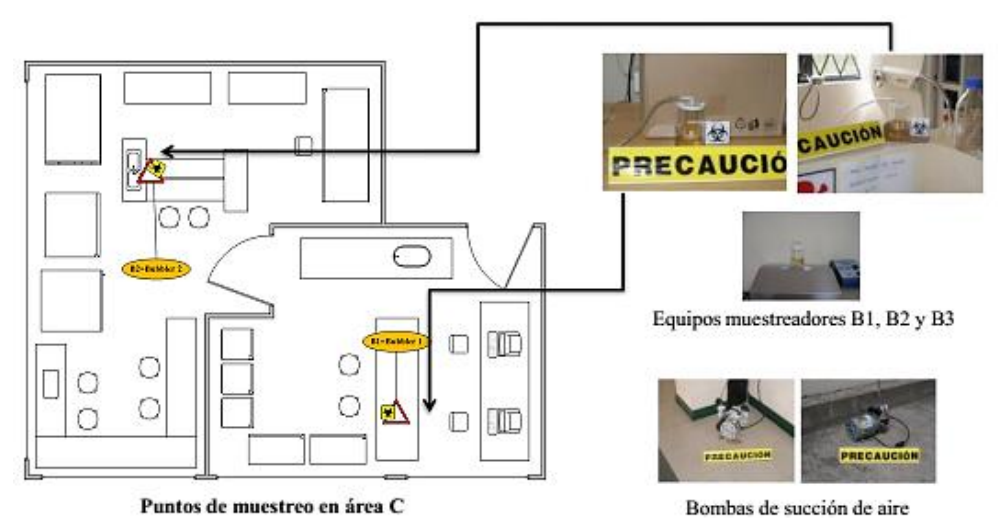


Figura 7. Muestreo *In situ* en el área de Biología Molecular (diagrama), se observan los puntos de muestreo B1 y B2, los dispositivos de captación de bioaerosoles y las bombas de succión de aire (López M., 2012).

2.2.13 Procesamiento de las muestras de bioaerosoles

Después del muestreo, primero se drenó el líquido de recolección (40 mL) y luego se llenó con 40 mL de caldo TSB (en lugar de agua destilada esterilizada utilizada por Agranovski et al. (2002) y se colocaron en un agitador Mini Vortex, durante 10 minutos para eliminar microorganismos posiblemente restantes en el interior del medio poroso. El líquido de lavado se drenó y luego se mezcló con el líquido original de recolección (Agranovski, Agranovski, Reponen, Willeke, & Grinshpun, 2002). El volumen final del líquido de recolección después de este proceso fue de 80 mL por cada equipo muestreador, que se analizó en etapas posteriores. Se emplearon frascos estériles de 100 mL para la conservación de muestras y alícuotas (figura 8).

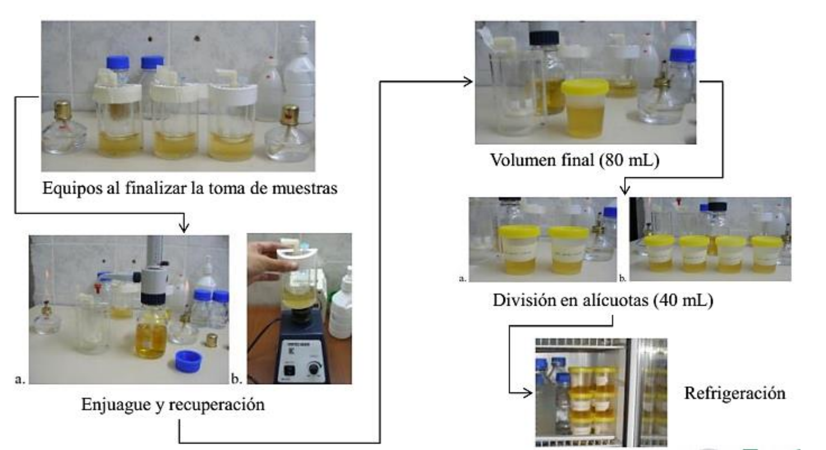


Figura 8. Esquema del procesamiento de las muestras de bioaerosoles de las áreas del laboratorio (López M., 2012).

El volumen total de las muestras líquidas de cada equipo muestreador (80 mL) se dividió en dos alícuotas, una para la enumeración bacteriana y la otra para la enumeración fúngica (Agranovski, Agranovski, Reponen, Willeke, & Grinshpun, 2002). A continuación se mantuvieron las muestras de bioaerosoles, bacterias y hongos, (alícuotas finales de 40 mL de medio TSB) a bajas temperaturas (4 °C), pero evitando su congelamiento (NIOSH, 1998).

2.3 Análisis de laboratorio

2.3.1 Recuento total de partículas biológicas y no biológicas

Se utilizó una cámara de Neubauer (Morris, 1995), y se realizó el recuento a partir de cada alícuota final (40 mL de medio TSB) de las muestras de cada equipo muestreador, sin factores de dilución, determinándose los valores según la ecuación (Ooi, 1997):

$$\text{Número de células en 1 mL de la suspensión original} = \text{Número promedio de células por cuadrado cúbico} \times \text{Número de cuadrados cúbicos en 1 mL (20 000 000)} \times \text{Factor de dilución}$$

2.3.2 Recuento de bioaerosoles viables y no viables

La técnica de propagación en placa estándar fue usada para determinar el recuento de bioaerosoles, bacterias y hongos, cultivables (Agranovski, Agranovski, Reponen, Willeke, & Grinshpun, 2002), (Prescott, Harley, & Klien, 2008). Para determinar la viabilidad se observó la capacidad de las células para dividirse y formar colonias (Agranovski, Agranovski, Grinshpun, Reponen, & Willeke, 2002). Se realizó una dilución seriada (Agranovski, Agranovski, Reponen, Willeke, & Grinshpun, 2002), una alícuota (0,1 mL) de una adecuada dilución de 10^{-1} y 10^{-3} el volumen del líquido de recolección, que contiene los bioaerosoles, se extendió sobre la superficie del medio Tripticase Soy Agar Difco (TSA) con 0,04% de actidiona Sigma Aldrich para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, mientras que para los hongos cultivables se realizó el mismo procedimiento pero en medio BD Malt Extract Agar (MEA) con 0,01% de cloranfenicol Himedia (Agranovski, Agranovski, Reponen, Willeke, & Grinshpun, 2002), (NIOSH, 1998).

Las diluciones de las muestras se cultivaron en cajas Petri de vidrio de 90 mm de diámetro, los medios TSA se incubaron durante 3 días a 37 °C y los medios MEA se incubaron por 5 días a 30 °C, dependiendo del crecimiento de las colonias (Gangneux, Gangneux, Tanquerel, Poisson, & Guiguen, 2006). Para la enumeración de bioaerosoles, bacterias y hongos, se usó un contador de colonias Quebec.

Los números de colonias de bioaerosoles, bacterias y hongos, viables se establecieron como UFC/mL en los medios TSA y MEA según la ecuación (Gamazo, 2005).

$$Número\ de\ UFC/mL = \frac{Número\ de\ colonias\ x\ factor\ de\ dilución}{ml\ sembrados\ en\ la\ placa}$$

El ***porcentaje de microorganismos viables*** (Silva, Jean, Vidmantas, & Grinshpun, 1996) se determinó mediante la relación entre los que crecen en los medios TSA y MEA después de la dilución y el recuento total, de la siguiente forma:

$$\%Microorganismos\ viables = \frac{Microorganismos\ viables}{Recuento\ total}\ x100\%$$

El ***porcentaje de microorganismos no viables*** (Silva, Jean, Vidmantas, & Grinshpun, 1996) se estableció mediante:

$$\%Microorganismos\ no\ viables = 100\% - Microorganismos\ viables$$

2.3.3 Determinación de la concentración de bioaerosoles

Después de la incubación, las colonias se contaron y los resultados se utilizaron para calcular las concentraciones de bioaerosoles, C; en UFC/m^3 (Agranovski, Agranovski, Reponen, Willeke, & Grinshpun, 2002), de acuerdo a la ecuación:

$$C = \frac{N(t)}{tQ}\frac{V_{LIQ}}{V_{ALIQ}}$$

Donde N(t), número de colonias cultivadas a partir del fluido de recolección, determinado por la técnica estándar de placa, después de que los microorganismos fueron recogidos durante el muestreo; Q, es el caudal de muestreo; t, tiempo de muestreo; V_{LIQ}, volumen del líquido de recolección resultante después del muestreo más el volumen de líquido utilizado para el lavado; V_{ALIQ}, volumen del líquido de recolección utilizado para el análisis.

2.3.4 Corrección de las mediciones observadas

Las mediciones observadas de concentraciones de contaminantes comunes del aire deberán corregirse de acuerdo a las condiciones de la localidad en que se efectúen dichas mediciones (TULAS, 2011); por consiguiente, en esta investigación se corrigieron los resultados del recuento total de partículas y de las concentraciones de bioaerosoles en las distintas áreas, para lo cual se utilizó la siguiente ecuación:

$$Cc = Co * \frac{760\ mmHg}{Pbl\ mmHg} * \frac{(273 + t\,℃)\ ℉}{298\ ℉}$$

Donde: Cc: concentración corregida; Co: concentración observada; Pbl: presión atmosférica local, en milímetros de mercurio; t °C: temperatura local, en grados centígrados.

2.3.5 Identificación de bioaerosoles

Por lo general las bacterias mesófilas suelen identificarse hasta la especie y los hongos a nivel de género (NIOSH, 1998). En esta investigación se realizó lo recomendado por la norma *NIOSH 0800 Bioaerosols Sampling*.

2.3.6 Selección de bioaerosoles (bacterias y hongos)

Se realizó una evaluación morfológica (Goldman & Green, 2009) y se escogieron las colonias distintas de las diluciones de bioaerosoles, bacterias y hongos, (10^{-1} y 10^{-3}), resultantes del proceso de muestreo, para su aislamiento y posterior identificación.

2.3.7 Aislamiento de bioaerosoles (bacterias y hongos)

Se aislaron las colonias de bioaerosoles, bacterias y hongos, seleccionadas preliminarmente, empleando la técnica de agotamiento de estrías (Prescott, Harley, & Klien, 2008) en cajas Petri de vidrio de 90 mm de diámetro con medios TSA con 0.04% de actidiona y MEA con 0.01% de cloranfenicol (Agranovski, Agranovski, Reponen, Willeke, & Grinshpun, 2002), respectivamente. Los medios TSA se incubaron durante 3 días a 37 °C y los medios MEA se incubaron por 5 días a 30 °C (Gangneux, Gangneux, Tanquerel, Poisson, & Guiguen, 2006). Sin embargo, se volvieron a aislar ciertas colonias de bioaerosoles bacterias y hongos, seleccionadas, en medio BD Potato Dextrose Agar (PDA) y se incubaron a 30 °C., debido a los resultados obtenidos.

2.3.8 Identificación de bioaerosoles (bacterias)

Se realizó una Tinción Gram, tinción diferencial, a las colonias de bioaerosoles (bacterias) cultivadas en el medio TSA para determinar si son Gram positivos o Gram negativos (Gamazo, 2005; Prescott, Harley, & Klien, 2008).

Para las bacterias Gram positivas se utilizó la Prueba de la Catalasa para determinar si son *Streptococcus* o *Staphylococcus* (Mac Faddin, 2003; Prescott, Harley, & Klien, 2008). Para las bacterias Gram negativas se empleó la Prueba de la Oxidasa para evidenciar si son *Pseudomonas* o Enterobacterias (Mac Faddin, 2003; Prescott, Harley, & Klien, 2008). Luego de estas pruebas y con los resultados obtenidos, con el objetivo de determinar la o las especies de bioaerosoles bacterias (NIOSH, 1998), se efectuaron pruebas bioquímicas.

Además, se realizó un antibiograma en medio BD Mueller Hinton, a ciertos bioaerosoles bacterias, debido a los resultados de identificación observados, en donde se aplicaron como antibacterianos al cloranfenicol 0,01%, al etanol 70% y a la estreptomicina BD 300 µg.

Tabla 1. Pruebas bioquímicas empleadas para la caracterización de bioaerosoles bacterias del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la ESPE (López M., 2012).

Pruebas bioquímicas	Medio empleado
Triple Azúcar Hierro (TSI) (Mac Faddin, 2003; Bailón, González, & Cervantes, 2003)	TSI Agar Difco
Citrato de Simmons) (Citrato) (Mac Faddin, 2003; Bailón, González, & Cervantes, 2003)	Simmons Citrate Agar BD
Sulfuro Indol Movilidad (SIM) (Mac Faddin, 2003; Bailón, González, & Cervantes, 2003)	SIM Agar BD
Ureasa (Urea) (Mac Faddin, 2003; Bailón, González, & Cervantes, 2003)	Urea Agar Base BD y Urea BD
Reacción de Rojo de Metilo (MR) (Mac Faddin, 2003; Bailón, González, & Cervantes, 2003)	MR-VP Agar Difco
Reacción de Voges Proskauer (VP) (Mac Faddin, 2003; Bailón, González, & Cervantes, 2003)	MR-VP Agar Difco
D-Manitol y tolerancia al NaCl (Manitol) (Flores, Belanche, & Anicet, 2009)	Manitol Salt Agar Oxoid
Producción de Piocianina (King A) (Flores, Belanche, & Anicet, 2009)	Pseudomonas Agar (for Pyocianine) Himedia
Fenilalanina Desaminasa (PPA) (Hernández Calleja, 2003; Flores, Belanche, & Anicet, 2009)	Phenylalanine Agar Difco
Fermentación de la Lactosa (MacConkey) (Flores, Belanche, & Anicet, 2009)	MacConkey Agar Difco
Xilosa, L-Lisina, Desoxicolato (XLD) (Flores, Belanche, & Anicet, 2009)	XLD Agar Acumedia
Fermentación de carbohidratos Ramnosa, Sucrosa, Celobiosa, Maltosa (Mac Faddin, 2003; Bailón, González, & Cervantes, 2003)	Red Broth Base Agar Difco y carbohidratos Ramnosa, Sucrosa, Celobiosa, Maltosa (Himedia)

Caracterización del género y especie

Por último, se utilizó el software IDENTAX Bacterial Identification System[1], para la identificación asistida por ordenador de los microorganismos mediante el uso de los resultados obtenidos a partir de pruebas bioquímicas convencionales. El programa utiliza el conocimiento existente de los diversos grupos científicos de trabajo, los cuales generosamente producen matrices que contienen las probabilidades *a priori* de un conjunto de taxones respuesta (de una manera positiva o negativa) de una prueba específica; además, permite la importación de matrices de referencia en formatos XLS y CSV, así, cualquier usuario puede crear sus propios conjuntos de datos o utilizar los publicados en la literatura (Flores, Belanche, & Anicet, 2009).

2.3.9 Identificación de bioaerosoles (hongos)

Se efectuó una evaluación de la morfología macroscópica de las colonias de bioaerosoles (hongos) cultivadas en el medio MEA para determinar si son hongos levaduriformes o filamentosos (Pratts, 2005). Para los hongos filamentosos, se realizaron una observación microscópica del micelio aéreo mediante la técnica del celo (cinta adhesiva) y una tinción con Azul de Lactofenol (Pratts, 2005). Para los hongos levaduriformes, se ejecutaron una tinción de KOH y azul de metileno modificada (Koch & Viera, 2008), y una tinción Gram (Gamazo, 2005).

Caracterización del género

Luego de estas pruebas, los resultados obtenidos se compararon con bibliografía actualizada con el objetivo de determinar el o los géneros de bioaerosoles hongos (NIOSH, 1998).

[1] Flores, Oscar; Belanche, Lluís; Anicet, Blanch; IDENTAX Bacterial Identification System, Versión 1.1, 2012, Universitat Politècnica de Catalunya, URL: http://www.identax.org/

2.4 Análisis Estadístico

Las muestras de bioaerosoles fueron tomadas en las tres áreas del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la ESPE. Se realizó un muestreo, en dos puntos del área de trabajo, en jornadas de ocho horas continuas, durante tres días consecutivos por área del laboratorio. Se aplicó un Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA) con tres tratamientos (áreas del laboratorio) y tres repeticiones (días de muestreo).

El análisis de los resultados se ejecutó con ayuda del programa estadístico InfoStat[2], donde se generaron los análisis de varianza (ANOVA) para las interacciones entre los factores descritos para el diseño planteado. También se realizó la prueba LSD de Fisher para determinar los subconjuntos de homogeneidad y para verificar los supuestos del ANOVA se desarrollaron las pruebas de Shapiro Wilks, del Estadístico de Levene y de la Independencia. Los resultados finales obtenidos se compararon con “Valores de Referencia" de bioaerosoles bacterianos y fúngicos de diferentes países (Mandal & Brandl, 2011), y a continuación se emitieron conclusiones.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Investigación de campo

3.1.1 Construcción previa del muestreador de burbujeo experimental

Para esta investigación se construyeron tres prototipos muestreadores (figura 9) a los que se denominaron B1 (Bubbler 1), B2 (Bubbler 2) y B3 (Bubbler 3), dos para recolección de bioaerosoles (B1 y B2) y uno para el blanco (B3).

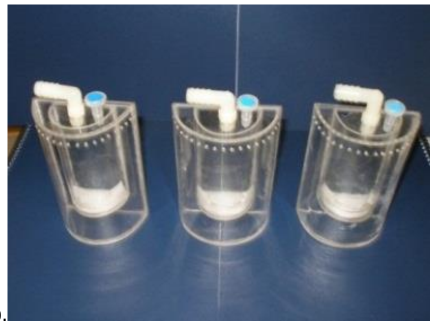
a.  b. 

Figura 9. Equipos muestreadores B1, B2 y B3 (Agranovski et al., 2002) construidos para la Evaluación de Bioaerosoles (bacterias y hongos): a. Vista frontal, b. Vista frontal superior (López M., 2012).

---

[2] Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

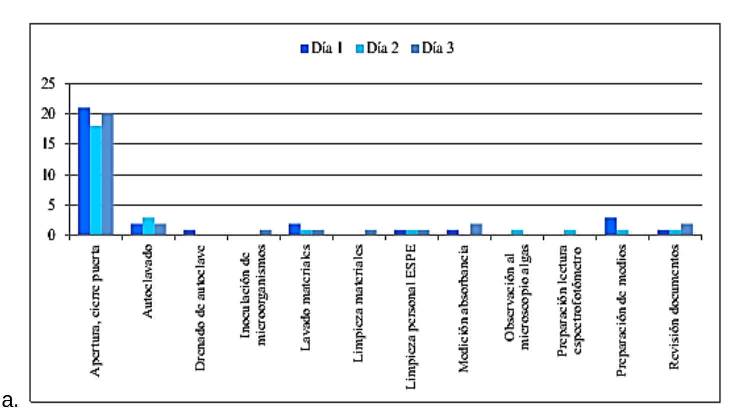
El PVC y el acrílico tienen aplicaciones similares, en esta investigación el uso de la forma plástica acrílico como recipiente contenedor no afectó los resultados de recolección de los bioaerosoles. Además, el uso de distintos materiales de construcción está extendido en los equipos comerciales, por ejemplo el Biosampler de SKC Inc. (2012) es de vidrio, el Six-Stage Viable Andersen Cascade Impactor de Thermo Fisher Scientific Inc. (2012) es de aluminio, entre otros.

3.1.2 Evaluación del entorno de trabajo

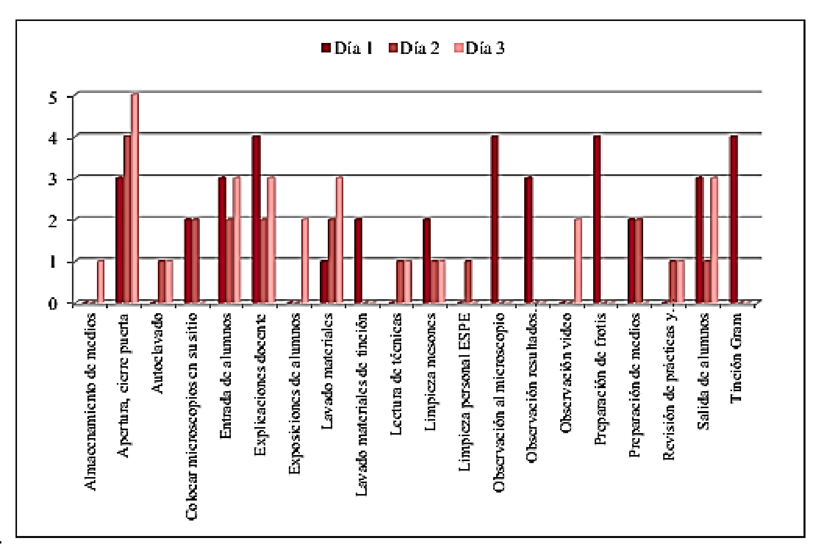
Este proceso se realizó en las tres áreas del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología y se registró la información durante los días de muestreo (figuras 10 y 11). En las áreas A, B y C se encontraron en la parte exterior, en términos generales, que las estructuras, paredes y techos de estas zonas estaban en buen estado y con poco polvo. De manera global, en la parte interior de las tres áreas, se determinaron que los parámetros: puertas, paredes, techos, instalaciones de luz, alrededor de los cables, uniones en las estructuras, pisos, conductos de tuberías, equipos, estaban en buenas condiciones, con poco polvo y no había evidencias visibles de fuentes microbianas, nutrientes o agua. También se señala que ninguna de las áreas posee sistemas de ventilación o filtración de aire; además la infraestructura física (pisos, mesas de trabajo, ventanas) no cumplen con los requerimientos adecuados para un laboratorio de Microbiología.

Se registraron las actividades desarrolladas en el ambiente laboral de las tres áreas durante la evaluación de bioaerosoles. El número de personas promedio en los ambientes laborales de las áreas A, B y C durante el periodo de muestreo fue de 7, 14 y 5, respectivamente.

En el área de Investigaciones (área A) del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología. Se documentó 12 actividades distintas y la que registra el mayor número de repeticiones es la de “apertura, cierre puerta”. En el área de Docencia (área B) se registró 20 actividades diferentes y las que tuvieron el mayor número de repeticiones son las de “apertura, cierre puerta”, “explicaciones docente”, “observación al microscopio”, “preparación de frotis” y “tinción Gram”. En el área de Biología Molecular se anotó 11 actividades disímiles y las que mostraron el mayor número de repeticiones son las de “apertura, cierre puerta” y “trabajo de oficina”.

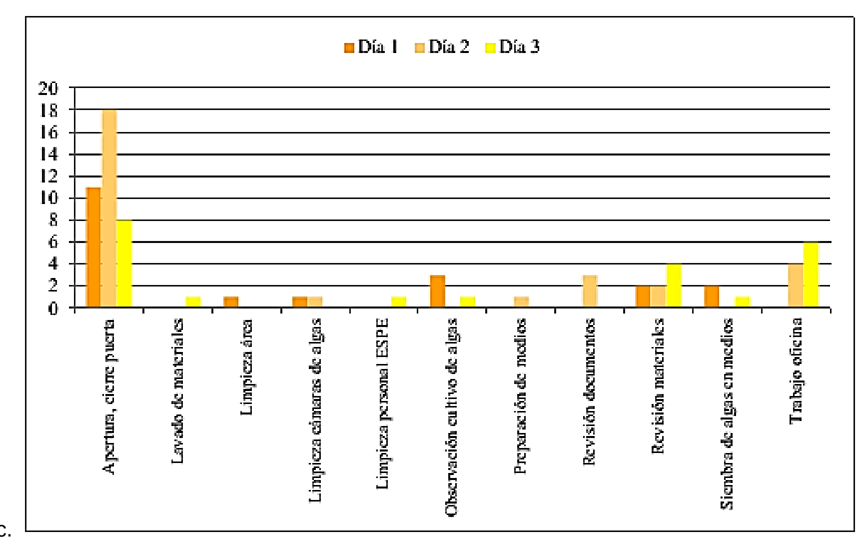


a.



b.

Figura 10. Actividades y número de sucesos registrados en el área de Investigaciones (a.) y en el área de Docencia (b.) durante la Evaluación de Bioaerosoles (bacterias y hongos) (López M., 2012).



c.

Figura 11. Actividades y número de sucesos registrados en el área de Biología Molecular (c.) durante la Evaluación de Bioaerosoles (bacterias y hongos) (López M., 2012).

Las actividades desarrolladas en las áreas del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología, corresponden a las esperadas en las sedes de docencia e investigación de una universidad, existe una gran cantidad de personas en movimiento, la apertura y cierre de puertas es continuo, los diálogos son frecuentes, se realizan trabajos de enseñanza, del tipo técnico y de oficina, entre los más importantes. Por lo tanto, se pueden asociar acciones comunes entre todas las actividades, tales como el movimiento del aire generado por las personas al caminar, al hablar, toser, estornudar, la reaerolización de partículas del piso y de las superficies, entre otras. Los estudios basados en el balance de

masa interior/exterior y en modelos de distribución de las fuentes de bioaerosoles han demostrado que, además de las partículas suspendidas en el aire exterior, el material resuspendido de las superficies como resultado de las actividades humanas es una fuente importante de partículas en el aire de interiores (Hospodsky, y otros, 2012)

3.1.3 Temperatura, humedad relativa y presión atmosférica

La presión atmosférica intermedia en las tres áreas fue de 563 mm Hg. En el área A la temperatura media fue de 24,67 °C y la humedad relativa promedio fue de 42,33%; en el área B fueron en orden, 22 °C y 47,33%, en el área C fueron de 22 °C y de 38,33%, respectivamente. El aumento de la temperatura conlleva a recuentos elevados de microorganismos y esporas de hongos en el aire; y la baja humedad relativa interior, menor al 70%, provoca desecación y puede conducir a la pérdida de viabilidad.

3.2 Análisis de laboratorio

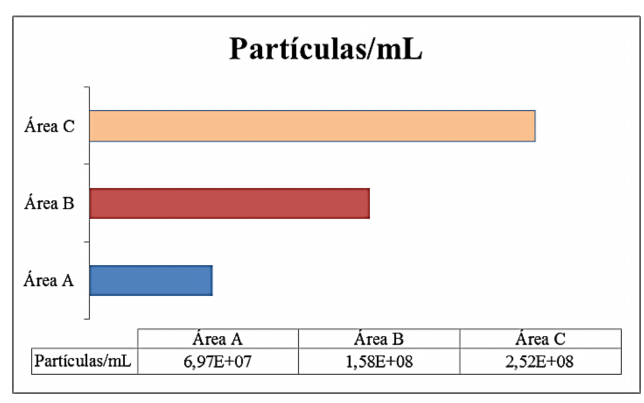
3.2.1 Recuento total de partículas biológicas y no biológicas

En el área de Investigaciones, se encontró que el recuento promedio total de partículas, biológicas y no biológicas, fue de $6,967x10^7$ partículas/mL. El día 2 del muestreo tuvo el mayor número con $1,011x10^8$, seguido de los días 1 y 3 con una cifra similar de $5,394x10^7$. El punto de muestreo B1 dio un promedio de $6,293x10^7$, mientras que el punto B2 resultó con $7,641x10^7$.

En cuanto al área de Docencia, se encontró que el recuento promedio total de partículas, biológicas y no biológicas, fue de $1,581x10^8$ partículas/mL. El día 3 del muestreo tuvo el mayor número de partículas con $2,272x10^8$, seguido del día 2 con $1,871x10^8$ y el día 1 con $6,013x10^7$. El punto de muestreo B1 dio un promedio de $1,247x10^8$, mientras que el punto B2 resultó con $1,915x10^8$.

En lo que concierne al área de Biología Molecular, se encontró que el recuento promedio total de partículas, biológicas y no biológicas, fue de $2,517x10^8$ partículas/mL. El día 3 del muestreo tuvo el mayor número con $2,873x10^8$, seguido del día 2 con $2,606x10^8$ y el día 1 con $2,071x10^8$. El punto de muestreo B1 dio un promedio de $1,871x10^8$, mientras que el punto B2 resultó con $3,163x10^8$.

El área de Investigaciones reportó una menor concentración que las áreas de Docencia y de Biología Molecular (figura 12). Esto se explica, muy probablemente, por el hecho de que el área A tiene menor tamaño en relación a las áreas B y C. Las altas concentraciones pueden ser resultado, en gran medida, del ambiente exterior, la ocupación humana y de la falta de un sistema de control de aire adecuado.



	Área A	Área B	Área C
Partículas/mL	6,97E+07	1,58E+08	2,52E+08

Figura 12. Recuento total de partículas en las áreas de Investigaciones, Docencia y Biología Molecular del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la ESPE usando una cámara de Neubauer (López M., 2012).

3.2.2 Recuento de bioaerosoles viables y no viables

El cultivo de los biocontaminantes en suspensión del aire y de los asociados a la superficie puede ser afectado por factores ambientales, prácticas muestreo, el transporte de la muestra y las condiciones de cultivo del laboratorio (Stetzenbach, Buttner, & Cruz, 2004). Según Adhikari, Reponen, Grinshpun, Martuzevicius, & LeMasters (2005) una parte significativa de aerosol atmosférico es de origen biológico, aproximadamente el 24% del recuento del total de las partículas atmosféricas y un 5-10% de la masa de partículas totales en suspensión son aportados por los bioaerosoles.

En el área de Investigaciones se halló que el promedio del número de colonias viables como UFC/mL fue de 2,412x10^5. El día 3 del muestreo presentó el mayor número de colonias con 4,342 x10^5, seguido por el día 1 con 1,733x10^5 y del día 2 con 1,162x10^5. El punto de muestreo B1 mostró un promedio de 1,845x10^5, y el punto B2 resultó con 2,845x10^5. Se debe destacar que la concentración de todos los bioaerosoles supuestos hongos viables, permaneció entre 0 y 300 UFC/mL, que en la identificación posterior se comprobó que eran bacterias resistentes al cloranfenicol (figura 13).

En el área de Docencia se encontró que el promedio del número de colonias viables como UFC/mL fue de 1,399x10^6. El día 2 del muestreo presentó el mayor número de colonias con 1,926x10^6, seguido por el día 3 con 1,285x10^6 y del día 1 con 9,876x10^5. El punto de muestreo B1 mostró un promedio de 1,093x10^6, y el punto B2 resultó con 1,705x10^6. Se señala también que los bioaerosoles establecidos como hongos viables, tuvieron una concentración entre 0 y 1,4x10^5 UFC/mL; sin embargo, en la identificación posterior se encontró un sólo hongo filamentoso y el resto fueron bacterias resistentes al cloranfenicol (figura 13).

En el área de Biología Molecular se obtuvo que el promedio del número de colonias viables como UFC/mL fue de 4,299x10^6. El día 2 del muestreo presentó el mayor número de colonias con 5,870x10^6, seguido por el día 3 con 4,878x10^6 y del día 1 con 2,149x10^5. El punto de muestreo B1 mostró un promedio de 2,729x10^6, y

el punto B2 resultó con $5{,}869x10^6$. Se remarca que los bioaerosoles asignados como hongos viables, tuvieron una concentración como UFC/mL entre 200 y $2{,}2x10^5$; no obstante, en la identificación posterior se verificó que fueron bacterias resistentes al cloranfenicol (figura 13).

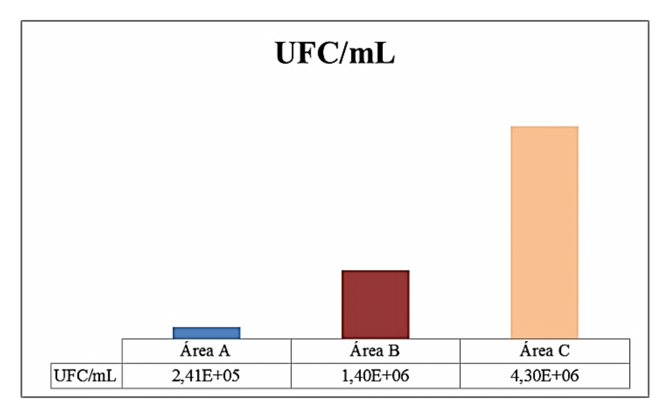


Figura 13. Recuento de bioaerosoles (bacterias y hongos) viables como UFC/mL en las área de Investigaciones, Docencia y Biología Molecular del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la ESPE (López M., 2012).

También se estableció que los porcentajes de microorganismos viables fueron muy bajos, 0,654% para el área A, 1,282% para el área B y 2,386% para el área C. Estos datos se corroboran con los presentados por Peccia & Hernández (2006) con niveles de viabilidad de bioaerosoles bacterias y hongos entre 0.001% y 40% en distintos escenarios de muestreo.

3.2.3 Determinación de la concentración de bioaerosoles (bacterias y hongos)

Las concentraciones de los bioaerosoles se establecieron de acuerdo a lo expuesto en el trabajo de Agranovski, Agranovski, Reponen, Willeke, & Grinshpun (2002). Es de importancia fundamental aclarar que al comparar las concentraciones de bioaerosoles cultivables determinadas en diferentes estudios, las técnicas de muestreo de aire, así como los métodos utilizados para la identificación tienen que ser similares o incluso idénticos (Mandal & Brandl, 2011).

En el área de Investigaciones sólo se hallaron bioaerosoles bacterias, no se encontraron bioaerosoles hongos, levaduriformes o filamentosos. La concentración promedio total de bioaerosoles bacterias fue de $1{,}355x10^8$ UFC/m^3, en tanto que la de bioaerosoles hongos fue de 0 UFC/m^3. En consecuencia, la concentración promedio total de bioaerosoles, bacterias y hongos, fue de $6{,}775x10^7$ UFC/m^3. Las concentraciones de bioaerosoles bacterias en el área A, en relación a los días de muestreo y a los puntos de muestreo definidos previamente, indican que el día 3 mostró la mayor concentración, seguida del día 1 y del día 2 con la menor concentración; el punto B1 mostró una concentración promedio menor que el punto B2.

En el área de Docencia se hallaron bioaerosoles bacterias y un bioaerosol hongo filamentoso. La concentración promedio total de bioaerosoles, bacterias y hongos, fue de $7{,}792 \times 10^{8}$ UFC/m^3; la de bioaerosoles bacterias fue de $8{,}402 \times 10^{8}$ UFC/m^3; mientras que para los bioaerosoles hongos fue de $3{,}712 \times 10^{4}$ UFC/m^3. Las concentraciones de bioaerosoles, bacterias y hongos, en el área B con referencia a los días de muestreo y a los puntos de muestreo definidos previamente enseñan que el día 2 manifestó la mayor concentración, le siguió el día 3 y por último el día 1; el punto B1 arrojó una concentración promedio menor que el punto B2.

Las concentraciones de bioaerosoles bacterias, en el área B en relación a los días de muestreo y a los a puntos de muestreo definidos previamente, el día 3 tuvo la menor concentración, le continuaron, en orden ascendente el día 1 y el día 3; el punto B1 obtuvo una concentración promedio menor que el punto B2. Las concentraciones de bioaerosoles hongos, en el área B en relación a los días de muestreo y a los a puntos de muestreo definidos previamente, revelaron que el día 1 tuvo la única concentración, los días 2 y 3 no registraron datos; el punto B1 no tuvo datos y el punto B2 mostró el único valor.

En el área de Biología Molecular sólo se observaron bioaerosoles bacterias, no se registraron bioaerosoles hongos, levaduriformes o filamentosos. La concentración promedio total de bioaerosoles bacterias fue de $2{,}394 \times 10^{9}$ UFC/m^3, en tanto que la de bioaerosoles hongos fue de 0 UFC/m^3. Por ende, la concentración promedio total de bioaerosoles, bacterias y hongos, fue de $1{,}197 \times 10^{9}$ UFC/m^3. Las concentraciones de bioaerosoles bacterias en el área C, en relación a los días de muestreo y a los puntos de muestreo definidos previamente, muestran en orden descendente que el día 2 reveló la mayor concentración, seguido del día 3 y del día 1; el punto B1 manifestó una concentración promedio menor que el punto B2.

La presencia mayoritaria de bioaerosoles bacterias evidencia que la ocupación humana y sus actividades, en conjunto con el ambiente exterior, facilitaron la proliferación de tales concentraciones. En un principio el hecho de que no existiesen bioaerosoles hongos en las zonas de estudio A y C, supondría que la calidad del aire interior es muy buena, sin embargo estos resultados pueden tener origen en la baja viabilidad de las esporas de hongos. Según Hsu, Kung, Wu, & Shen (2012) el nivel de los hongos transportados por el aire está estrechamente asociado con la humedad relativa interior, y la condición óptima para el crecimiento de hongos puede ser superior al 70%. También pueden influir factores como el tiempo de muestreo, el tipo de medio de recolección empleado, las diluciones seriadas, etc.

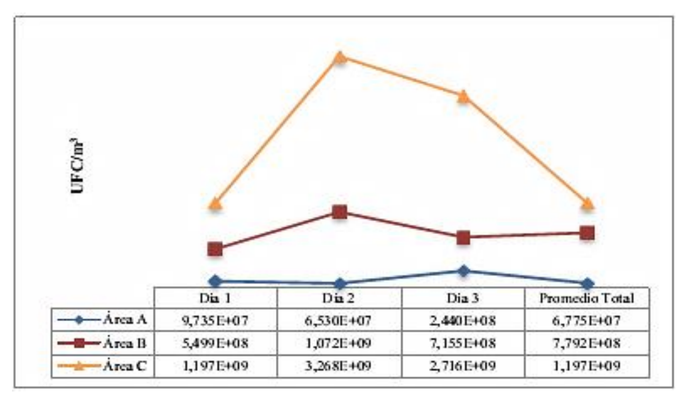
Tomando como base de comparación a la tabla "Valores de Referencia" de bioaerosoles bacterianos y fúngicos en diferentes países realizada por Mandal & Brandl (2011), entre ellos los de la Unión Europea con 10000 UFC/m^3 para bacterias y 10000 UFC/m^3 para hongos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) con 500 UFC/m^3 para bacterias y Holanda con 10000 UFC/m^3 para bioaerosoles totales (bacterias y hongos), se debe señalar que prácticamente todos los resultados de los bioaerosoles obtenidos en las áreas de Investigaciones, de Docencia y de Biología Molecular del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la ESPE exceden los valores publicados para las concentraciones aceptables de bioaerosoles.

3.2.4 Análisis estadístico de las concentraciones de bioaerosoles

La variación de la concentración promedio de bioaerosoles (bacterias y hongos) en las distintas áreas del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la ESPE se observa en la figura 14. El área A mostró la menor concentración ($6{,}775x10^7$ UFC/m^3), le sigue el área B ($7{,}792x10^8$ UFC/m^3) y por último el área C con la mayor concentración ($1{,}197x10^9$ UFC/m^3).

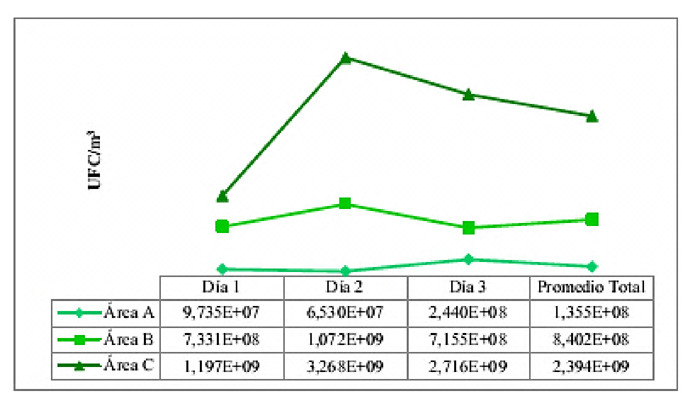
La concentración promedio de bioaerosoles (bacterias) en las distintas áreas del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la ESPE se aprecia en la figura 15. El área A presentó la menor concentración ($1{,}355x10^8$ UFC/m^3), seguido por el área B ($8{,}402x10^8$ UFC/m^3) y finalmente el área C con la mayor concentración ($2{,}394x10^8$ UFC/m^3).

La concentración promedio de bioaerosoles (hongos) en las distintas áreas del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la ESPE se muestra en la figura 16. Las áreas A y C no tuvieron concentraciones (0 UFC/m^3), el área B sí la evidenció ($3{,}712x10^4$ UFC/m^3).



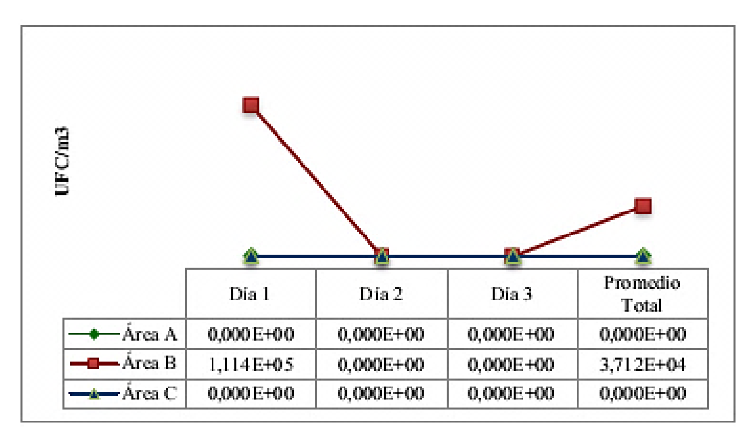
	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio Total
Área A	9,735E+07	6,530E+07	2,440E+08	6,775E+07
Área B	5,499E+08	1,072E+09	7,155E+08	7,792E+08
Área C	1,197E+09	3,268E+09	2,716E+09	1,197E+09

Figura 14. Concentración promedio de bioaerosoles (bacterias y hongos) como UFC/m^3 en las áreas A, B y C del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la ESPE en relación a los días de muestreo (López M., 2012).



	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio Total
Área A	9,735E+07	6,530E+07	2,440E+08	1,355E+08
Área B	7,331E+08	1,072E+09	7,155E+08	8,402E+08
Área C	1,197E+09	3,268E+09	2,716E+09	2,394E+09

Figura 15. Concentración promedio de bioaerosoles (bacterias) como UFC/m^3 en las áreas A, B y C del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la ESPE en relación a los días de muestreo (López M., 2012).



	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Promedio Total
Área A	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
Área B	1,114E+05	0,000E+00	0,000E+00	3,712E+04
Área C	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00

Figura 16. Concentración promedio de bioaerosoles (hongos) como UFC/m^3 en las áreas A, B y C del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la ESPE en relación a los días de muestreo (López M., 2012).

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) de los datos presentados, se encontró, por un lado, en lo que se refiere a los días de muestreo, con un nivel de significación del 0.05, que no existen diferencias entre las concentraciones de bioaerosoles (bacterias y hongos), entre las de bioaerosoles (bacterias) y entre las de bioaerosoles (hongos); por otro lado, en relación a las áreas del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología, con un nivel de significación del 0.05, sí existen diferencias entre las concentraciones de bioaerosoles (bacterias y hongos) y entre las de bioaerosoles (bacterias); pero no existen diferencias entre las concentraciones de bioaerosoles (hongos).

Para las concentraciones de bioaerosoles (bacterias y hongos) y de bioaerosoles (bacterias) la prueba LSD de Fisher, con un nivel de confianza del 95%, mostró, haciendo referencia a los días de muestreo, que las medias de los días 1, 2 y 3 son estadísticamente similares; en relación a las áreas del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología, las medias de las áreas A y B son estadísticamente análogos y la media del área C no lo es. Para las concentraciones de bioaerosoles (hongos) se obtuvo, en relación a las áreas del, que las medias de las áreas A, B y C son estadísticamente similares; haciendo referencia a los días de muestreo, las medias de los días 1, 2 y 3 son estadísticamente equivalentes.

Las pruebas de verificación de los supuestos del ANOVA realizadas a las concentraciones de bioaerosoles (bacterias y hongos) y de bioaerosoles (bacterias) fueron comprobadas; sin embargo, para las concentraciones de bioaerosoles (hongos) se rechazaron las hipótesis de normalidad y de independencia, y se aceptó la hipótesis de homogeneidad de varianza.

3.2.5 Selección de bioaerosoles (bacterias y hongos)

La evaluación morfológica de las distintas colonias de bioaerosoles bacterias, de las diluciones 10^{-1} y 10^{-3} en el medio TSA, provenientes del proceso de muestreo, permitió su separación para los análisis posteriores. Se debe indicar,

que en un inicio existió la presunción de que los bioaerosoles que crecieron en el medio MEA, con colonias semejantes a las bacterianas, eran hongos levaduriformes, pero en el transcurso de la identificación las evidencias señalaron que eran bacterias resistentes al cloranfenicol y debido a ésto se las incluyó como bioaerosoles bacterias. En lo que se refiere a los bioaerosoles hongos, de las tres áreas del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la ESPE, solamente se localizó uno en el área B.

De los bioaerosoles distintos seleccionados en el área de Investigaciones se encontraron 7 bacterias y 1 bacteria resistente al cloranfenicol (8 en total); en el área de Docencia se descubrieron 13 bacterias, 2 bacterias resistentes al cloranfenicol (15 en total) y 1 hongo (1 en total); por último en el área de Biología Molecular se hallaron 11 bacterias y 7 bacterias resistentes al cloranfenicol (18 en total). En las tres áreas del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología se seleccionaron en total 42 bioaerosoles, 41 del tipo bacteria (bacterias y bacterias resistentes al cloranfenicol) mesófilos, aerobios o facultativos, y 1 bioaerosol del tipo hongo filamentoso. En este estudio no se incluyeron otras condiciones (figura 17).

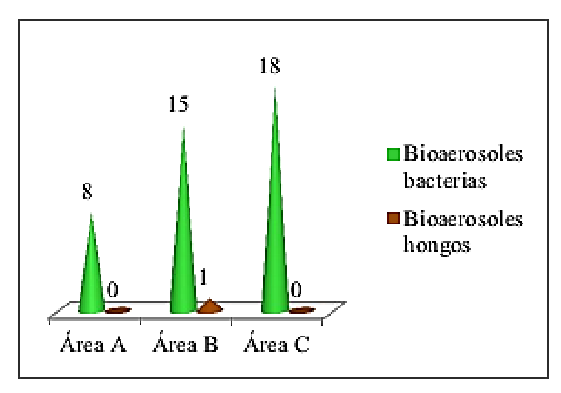


Figura 17. Número de bioaerosoles, bacterias y hongos, seleccionados de las áreas A, B y C para su aislamiento y posterior identificación (López M., 2012).

3.2.6 Aislamiento de bioaerosoles (bacterias y hongos)

Las colonias de bioaerosoles, bacterias y hongos, seleccionadas preliminarmente, fueron aisladas empleando la técnica de agotamiento de estrías. Los bioaerosoles bacterias resistentes al cloranfenicol y el bioaerosol hongo se aislaron nuevamente en medio PDA, debido a los resultados de identificación obtenidos. En este trabajo se encontraron tres grupos de bioaerosoles, las bacterias que crecieron en el medio TSA con 0,04% de actidiona, las bacterias resistentes al cloranfenicol que crecieron en el medio MEA con 0,01% de cloranfenicol y los hongos que crecieron en el medio MEA con 0,01% de cloranfenicol.

3.2.7 Identificación de bioaerosoles (bacterias)

En relación a los bioaerosoles bacterias, en el área de Investigaciones se hallaron 1 bacilo Gram positivo y 6 bacilos Gram negativos; en el área de Docencia se descubrieron 1 bacilo Gram positivo y 12 bacilos Gram negativos; en el área de Biología Molecular se localizaron 11 bacilos Gram negativos. En cuanto a los bioaerosoles bacterias resistentes al cloranfenicol, en el área de Investigaciones se halló 1 bacilo Gram positivo; en el área de Docencia se encontraron 2 bacilos Gram negativos; en el área de Biología Molecular se descubrieron 7 bacilos Gram negativos. De los 41 bioaerosoles del tipo bacteria se encontraron 3 catalasa negativa y 38 catalasa positiva; y se hallaron 23 oxidasa positiva y 18 oxidasa negativa.

Géneros y especies de bioaerosoles (bacterias) encontrados

Mediante el programa IDENTAX Bacterial Identification System y con los resultados de las pruebas bioquímicas de identificación se establecieron los géneros y especies de los bioaerosoles bacterias de las áreas de Investigación, de Docencia y de Biología Molecular (figura 18). Las matrices necesarias para extraer las características fenotípicas de cada taxón provienen de los autores del software.

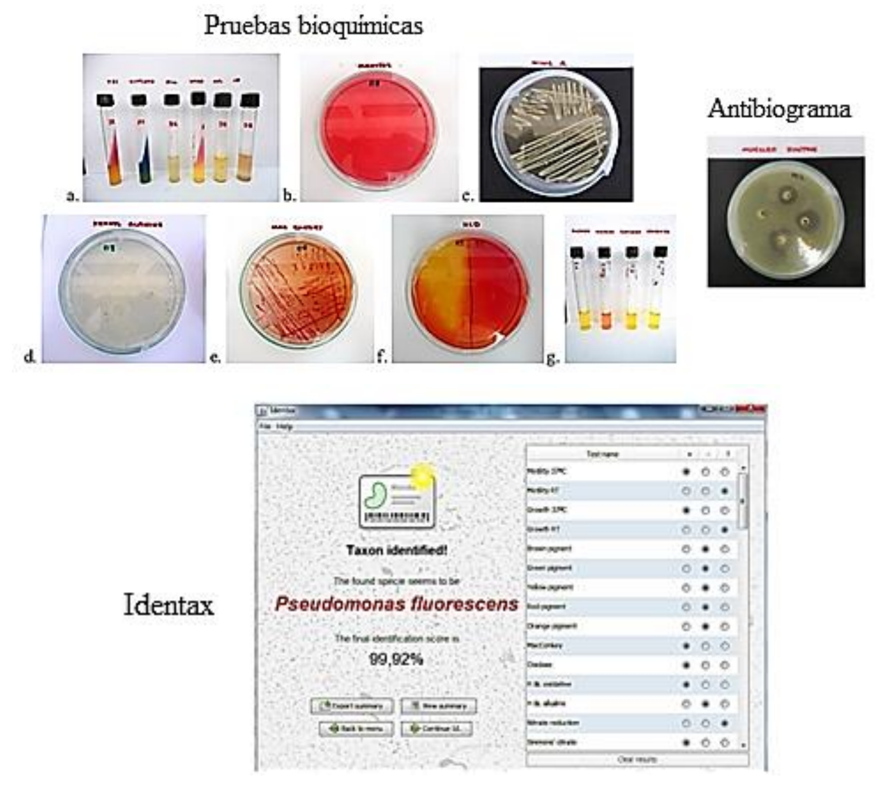


Figura 18. Pruebas bioquímicas, antibiograma e identificación con el programa Identax realizados a los bioaerosoles del tipo bacteria seleccionados de las áreas A, B y C (López M., 2012).

3.2.8 Identificación de bioaerosoles (hongos)

Se hizo la evaluación macroscópica de la morfología de los bioaerosoles que crecieron en el medio MEA. En esta etapa se presumió que tales bioaerosoles, con colonias semejantes a las bacterianas, eran hongos levaduriformes; por otro lado, también se descubrió un bioaerosol hongo del tipo filamentoso. A los bioaerosoles aparentemente hongos levaduriformes se les realizó una tinción de KOH y azul de metileno modificada y una tinción Gram. Aquí se demostró que éstos no eran levaduras sino bacterias con resistencia al cloranfenicol 0,01% debido a diferencias en sus estructuras; consecuentemente, los bioaerosoles señalados pasaron a formar parte del grupo bioaerosoles bacterias resistentes al cloranfenicol. Al único bioaerosol hongo filamentoso encontrado se le hizo una observación microscópica del micelio aéreo mediante la técnica del celo (cinta adhesiva) y una tinción con Azul de Lactofenol.

Géneros de bioaerosoles (hongos) encontrados

Con los resultados logrados y al compararlos con referencias bibliográficas se determinó el género del bioaerosol hongo filamentoso (figura 19).

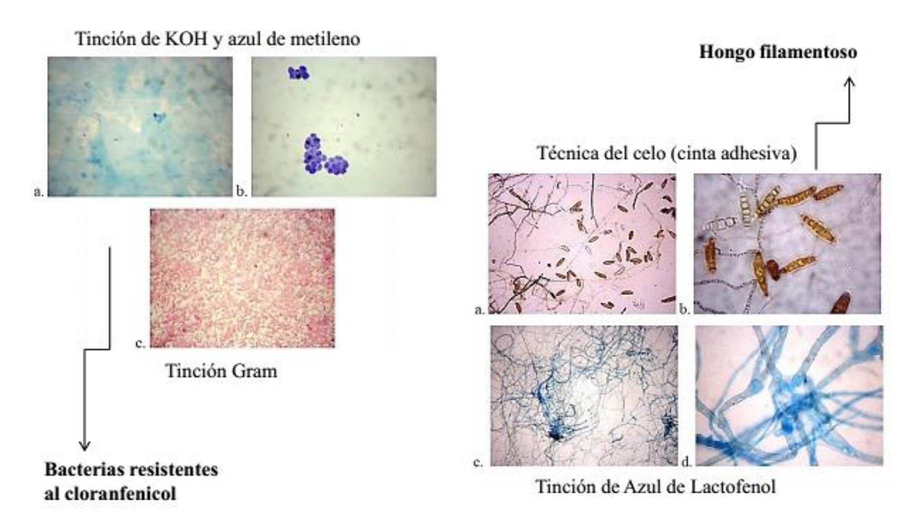


Figura 19. Tinción de KOH y azul de metileno modificada, tinción Gram, técnica del celo (cinta adhesiva) y tinción con Azul de Lactofenol realizada a los bioaerosoles del tipo hongo seleccionados de las áreas A, B y C (López M., 2012).

3.2.9 Detalle y localización de los bioaerosoles encontrados

El detalle y la ubicación de los bioaerosoles encontrados en el Laboratorio de Microbiología - Biotecnología se ilustran en las tablas 2, 3 y 4; y en las figuras 20, 21 y 22.

Se descubrió que los 42 microorganismos están inmersos en 21 tipos distintos de bacterias y 1 tipo de hongo filamentoso. En el área de Investigaciones se encontraron 8 bacterias que incluyen 7 especies; en el área de Docencia se hallaron 15 bacterias y 1 hongo filamentos dentro de 11 especies y 1 género; en el área de Biología Molecular se determinaron 18 bacterias pertenecientes a 16 especies.

Tabla 2. Género y especie de los bioaerosoles del tipo bacteria (bacterias y bacterias resistentes al cloranfenicol) hallados en el área de Investigaciones del Laboratorio de Microbiología -Biotecnología de la ESPE (López M., 2012).

Bioaerosoles	Género y especie	Probabilidad de identificación (Score)
Bacterias		
1205-A14B1-001-B1	*Pseudomonas mesophilica* NB refer SAB vol 29 pp. 6	Score: 99,68%
1205-A14B2-001-B1	*Bacillus cereus*	Score: 85,07%
1205-A15B1-002-B1	*Yersinia aldovae*	Score: 75,75%
1205-A15B2-002-B1	*Serratia plymuthica*	Score: 91,44%
1205-A16B1-003-B1	*Comamonas acidovorans*	Score: 98,51%
1205-A16B1-003-B2	*Comamonas acidovorans*	Score: 99,78%
1205-A16B2-003-B1	*Yersinia aldovae*	Score: 75,75%
Bacteria resistente al cloranfenicol		
1205-A14B1-001-B2	*Bacillus cereus*	Score: 97,74%

Tabla 3. Género y especie de los bioaerosoles del tipo bacteria (bacterias y bacterias resistentes al cloranfenicol) y género del bioaerosol hongo filamentoso hallados en el área de Docencia del Laboratorio de Microbiología -Biotecnología de la ESPE (López M., 2012).

Bioaerosoles	Género y especie	Probabilidad de identificación (Score)
Bacterias		
1205-B22B1-001-B1	*Ewingella americana*	Score: 78,98%
1205-B22B2-001-B1	*Ewingella americana*	Score: 94,34%
1205-B22B2-001-B2	*Flavimonas oryzihabitans.* Group Ve-2	Score: 80,44%
1205-B22B2-001-B3	*Pseudomonas picketti*	Score: 90,29%
1205-B22B2-001-B4	*Burkholderia cepacia*	Score: 90,31%
1205-B23B1-002-B1	*Ewingella americana*	Score: 94,43%
1205-B23B2-002-B1	*Pseudomonas fluorescens*	Score: 99,92%
1205-B23B2-002-B2	*Pseudomonas fluorescens*	Score: 97,27%
1205-B23B2-002-B3	*Bacillus lentus*	Score: 90,72%
1205-B24B1-003-B1	*Burkholderia cepacia*	Score: 90,31%
1205-B24B1-003-B2	*Enterobacter cloacae*	Score: 81,74%
1205-B24B1-003-B3	*Pseudomonas fluorescens*	Score: 97,53%
1205-B24B2-003-B1	*Pseudomonas fluorescens*	Score: 78,41%
Bacterias resistentes al cloranfenicol		
1205-B23B2-002-B4	*Comamonas acidovorans*	Score: 98,44%
1205-B24B2-003-B2	*Comamonas acidovorans*	Score: 98,99%

Bioaerosol	Género
Hongo	
1205-B22B2-001-H1	*Alternaria spp.*

Tabla 4. Género y especie de los bioaerosoles del tipo bacteria (bacterias y bacterias resistentes al cloranfenicol) hallados en el área de Biología Molecular del Laboratorio de Microbiología -Biotecnología de la ESPE (López M., 2012).

Bioaerosoles	Género y especie	Probabilidad de identificación (Score)
Bacterias		
1205-C28B1-001-B1	*Comamonas acidovorans*	Score: 99,79%
1205-C28B1-001-B2	*Pseudomonas taetrolens*	Score: 65,65%
1205-C28B1-001-B3	*Ewingella americana*	Score: 82,43%
1205-C28B2-001-B1	*Burkholderia cepacia*	Score: 69,49%
1205-C28B2-001-B2	*Pseudomonas fluorescens*	Score: 97,53%
1205-C29B1-002-B1	*Burkholderia mallei*	Score: 99,96%
1205-C29B1-002-B2	*Klebsiella planticola*	Score: 50,71%
1205-C29B2-002-B1	*Proteus mirabilis*	Score: 96,95%
1205-C30B1-003-B1	*Enterobacter cloacae*	Score: 81,74%
1205-C30B1-003-B2	*Flavimonas oryzihabitans.* Group Ve-2	Score: 95,89%
1205-C30B2-003-B1	*Pseudomonas fragi*	Score: 86,74%
Bacterias resistentes al cloranfenicol		
1205-C28B1-001-B4	*Comamonas acidovorans*	Score: 72,99%
1205-C28B2-001-B3	*Ewingella americana*	Score: 98,92%
1205-C28B2-001-B4	*Hafnia alvei biogroup 1*	Score: 99,29%
1205-C29B1-002-B3	*Pseudomonas pseudoalcaligenes*	Score: 80,50%
1205-C29B2-002-B2	*Proteus mirabilis*	Score: 95,32%
1205-C30B1-003-B3	*Pseudomonas picketti*	Score: 81,92%
1205-C30B2-003-B2	*Yersinia ruckeri*	Score: 97,40%

Área de Investigaciones (Área A)

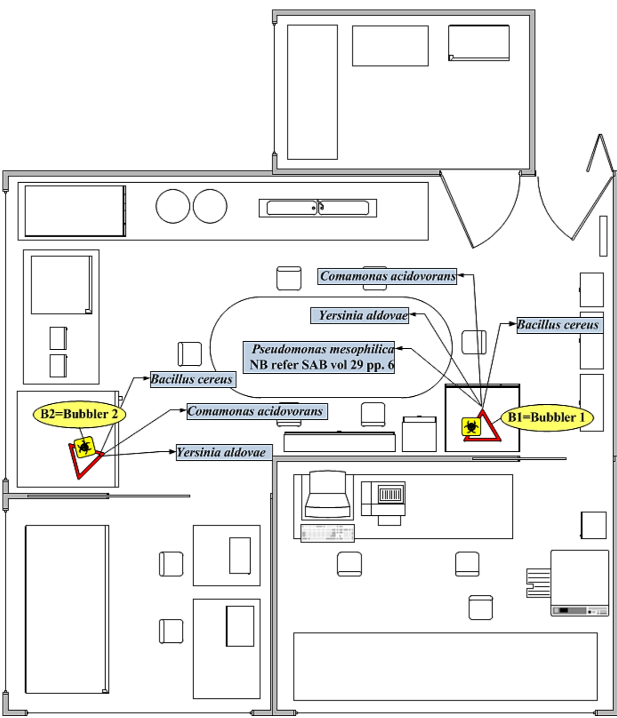


Figura 20. Detalle de bioaerosoles encontrados en el área de Investigaciones o área A, de acuerdo a los puntos de muestreo B1 y B2 (Vista de planta) (López M., 2012).

Área de Docencia (Área B)

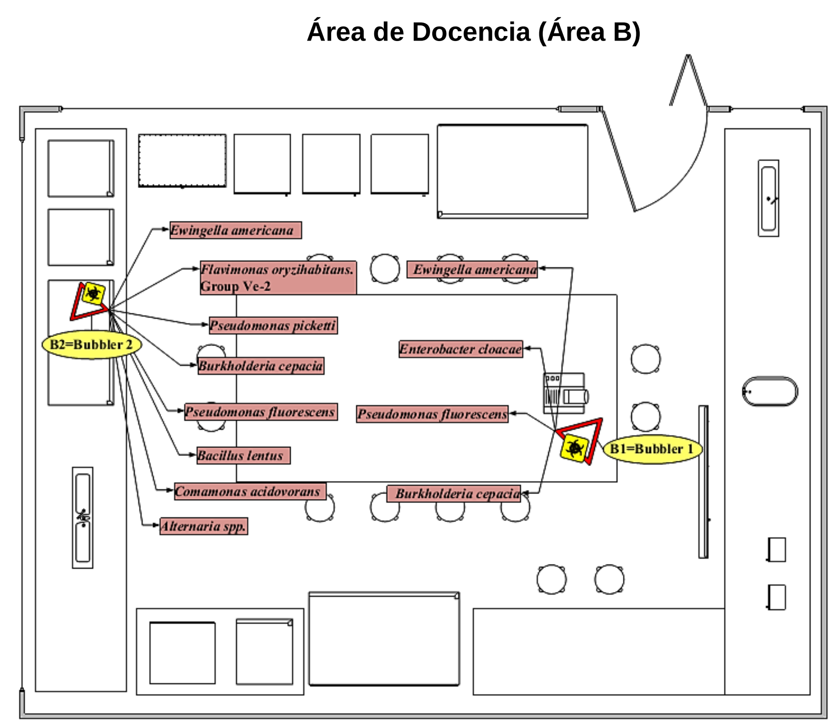


Figura 21. Detalle de bioaerosoles encontrados en el área de Docencia o área B, de acuerdo a los puntos de muestreo B1 y B2 (Vista de planta) (López M., 2012).

Área de Biología Molecular (Área C)

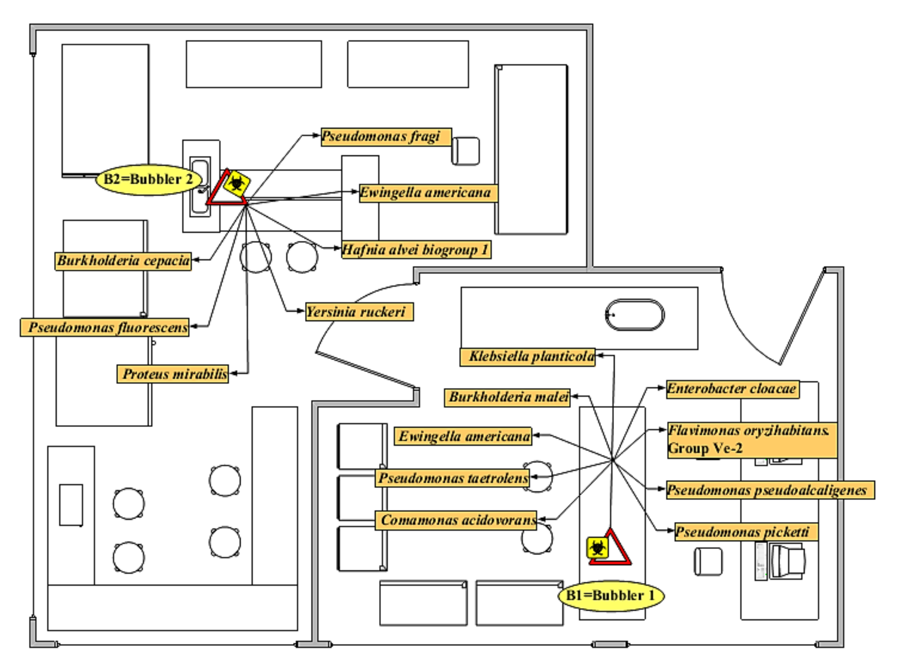


Figura 22. Detalle de bioaerosoles encontrados en el área de Biología Molecular o área C, de acuerdo a los puntos de muestreo B1 y B2 (Vista de planta) (López M., 2012).

En este trabajo se determinó que 15 bacilos Gram negativos pertenecían a la familia Enterobacteriaceae, 4 a la Burkholderiaceae y 19 a la Pseudomonadaceae, los 3 bacilos Gram positivos correspondían a la familia Bacillaceae; el único bioaerosol hongo filamentoso era de la familia Dematiaceae. En cuanto a los resultados sobre géneros de bioaerosoles descubiertos se obtuvo que 2 son de *Enterobacter,* 3 de *Yersinia*, 1 de *Serratia*, 5 de *Ewingella*, 4 de *Burkholderia*, 1 de *Klebsiella*, 2 de *Proteus*, 19 de *Pseudomonas*, 1 de *Hafnia*, 3 de *Bacillus* y 1 de *Alternaria spp*..

Hsu, Kung, Wu, & Shen (2012) sostienen que los microorganismos predominantes en el aire de los espacios cerrados son bacterias, y la mayoría de las fuentes de bacterias vienen de la presencia de seres humanos en ambientes no industriales interiores; los microorganismos prevalentes en el aire del ambiente exterior son hongos, y la mayoría de las fuentes de hongos son suelos, plantas, el aire libre y los cuerpos de agua. La existencia de un mayor porcentaje de bioaerosoles bacterias Gram negativos implica que la recolección de bacterias sensibles a los cambios de humedad relativa no es afectada por la técnica de muestreo utilizada en este estudio; asimismo señala que probablemente no están muy relacionadas, la baja recuperación de hongos del aire y la técnica de muestreo. El resultado de bacterias resistentes al cloranfenicol no es un fenómeno nuevo, sino relativamente frecuente y normal. A través de los años, las bacterias han desarrollado una serie de mecanismos que les permiten eludir los efectos inhibidores del cloranfenicol (Schwarz, Doublet, & Cloeckaert, 2004). Ésto implica que la concentración utilizada del antibacteriano no fue suficiente para aislar únicamente a los hongos.

3.2.10 Control de bioaerosoles

Los bioaerosoles, como un tipo de partículas de los aerosoles, son removidos cuando todas las partículas se han eliminado o capturado en su conjunto. Por lo tanto, las metodologías de control de aerosoles también pueden ser usadas para controlar los bioaerosoles, entre ellos están la radiación ultravioleta, filtración de aire, uso de la temperatura, emisión de iones artificiales, nanopartículas de plata en el aire, emisión de aire iónico (Lee, 2011), entre otros. No obstante, el mantenimiento preventivo es probablemente el método más importante para el control de bioaerosoles en los edificios existentes.

4 CONCLUSIONES

- En las tres áreas del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología evaluadas se determinó la existencia de bioaerosoles bacterias, bioaerosoles bacterias resistentes al cloranfenicol y bioaerosoles hongos.

- Las posibles fuentes de emisión de los bioaerosoles encontrados fueron el movimiento del aire generado por las personas al caminar, al hablar, toser, estornudar, la reaerolización de partículas del piso y de las superficies, así como también el aire proveniente del ambiente exterior.

- La apertura y cierre de puertas constituye la acción predominante que probablemente permite la proliferación de los bioaerosoles, además de la presencia de seres humanos, otras actividades y el aire exterior.

- La viabilidad de los bioaerosoles en las tres áreas analizadas se mantuvo entre 0,654% y 2,386% y los factores principales que posiblemente los afectaron son la humedad y la temperatura ambiental durante la evaluación.

- El área de Biología Molecular registró la mayor concentración de bioaerosoles, la de docencia mostró una concentración intermedia y la de investigaciones reveló la menor concentración.

- Se evidenció que casi todas las concentraciones de bioaerosoles detectadas excedieron los límites sugeridos por la Organización Mundial de la Salud, la Unión Europea, y Holanda.

- De las tres áreas del Laboratorio de Microbiología - Biotecnología se aislaron 42 bioaerosoles (41 bacterias y 1 hongo), 38 bioaerosoles bacterias fueron bacilos Gram negativos, mientras que 3 fueron bacilos Gram positivos, de igual manera se halló un sólo bioaerosol hongo filamentoso. Los bioaerosoles bacterias fueron predominantes sobre los hongos.

- Sobre los géneros de bioaerosoles descubiertos se obtuvieron *Enterobacter, Yersinia*, *Serratia*, *Ewingella*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Hafnia*, *Bacillus* y *Alternaria* sp.

- Se comprobó que la presencia de bioaerosoles, bacterias y hongos, en el Laboratorio de Microbiología - Biotecnología de la ESPE es significativa.

REFERENCIAS

1. Adhikari, A., Reponen, T., Grinshpun, S. A., Martuzevicius, D., & LeMasters, G. (2005). Correlation of ambient inhalable bioaerosols with particulate matter and ozone. *Environmental Pollution*, 16-28.
2. Agranovski, I. E., Agranovski, V., Grinshpun, S. A., Reponen, T., & Willeke, K. (2002). Collection of Airborne Microorganisms into Liquid by Bubbling through Porous Medium. *Aerosol Science and Technology*, 502-509.
3. Agranovski, I. E., Agranovski, V., Reponen, T., Willeke, K., & Grinshpun, S. (2002). Development and evaluation of a new personal sampler for culturable airborne microorganisms. *Atmospheric Environment 36*, 889–898.
4. Agranovski, I. E., Safatov, A. S., Pyankov, O. V., Sergeev, A. A., Sergeev, A. N., & Grinshpun, S. A. (2005). Long-Term Sampling of Viable Airborne Viruses. *Aerosol Science and Technology*, 912–918.
5. Ahmad Nasir, Z., & Colbeck, I. (2010). Assessment of Bacterial and Fungal Aerosol in Different Residential Settings. *Water Air Soil Pollut - Springer Science*, 367 –377.

6. Cartwright, C., Horrocks, S., Kirton, J., & Crook, B. (2009). *Review of methods to measure bioaerosols from composting sites - Science Report.* Inglaterra: Environment Agency.
7. Dietrich, D. (2009). *Una Introducción al Muestreo de Bioaerosoles.* USA: SKC Inc.
8. Flores, O., Belanche, L., & Anicet, B. (2009). New multiplatform computer program for numerical identification of microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 4133–4135.
9. Gamazo. (2005). *Manual de Prácticas de Microbiología.* México: Editorial Médica Panamericana.
10. Gangneux, J.-P., Gangneux, F. R., Tanquerel, J.-J., Poisson, M., & Guiguen, C. (2006). Bacterial and Fungal Counts in Hospital Air: Comparative Yields for 4 Sieve Impactor Air Samplers With 2 Culture Media. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 1405-1408.
11. Goldman, E., & Green, L. H. (2009). *Practical Handbook of Microbiology Second edition.* Boca Raton: CRC Press.
12. Goyal, R., & Khare, M. (2011). Chapter 10 Indoor Air Quality: Monitoring and Modeling Protocol for Urban School Buildings. En *Sick Building Syndrome in Public Buildings and Workplaces* (págs. 179-192). Springer Science.
13. Goyer, N., Levoie, J., Lazure, L., & Marchand, G. (2001). Bioaerosols in the Workplace: Evaluation, Control and Prevention Guide. *Études et Reserches*.
14. Hernández Calleja, A. (2003). NTP 611: Agentes biológicos: análisis de las muestras. *Instituto Nacional de seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT)*, 1-12.
15. Hospodsky, D., Qian, J., Nazaroff, W. W., Yamamoto, N., Bibby, K., Rismani-Yazdi, H., & Peccia, J. (2012). Human Occupancy as a Source of Indoor Airborne Bacteria. *PLoS ONE*, 1-11.
16. Hsu, Y.-C., Kung, P.-Y., Wu, T.-N., & Shen, Y.-H. (2012). Characterization of Indoor-Air Bioaerosols in Southern Taiwan . *Aerosol and Air Quality Research*, 651-661.
17. Koch, A., & Viera, N. (2008). *Manual de Laboratorio de Microbiología I - ESPE.* Sangolquí: ESPE.
18. Lazaridis, M., & Colbeck, I. (2010). Chapter 1 Environmental Levels. En *Human Exposure to Pollutants via Dermal Absorption and Inhalation - Environmental Pollution* (págs. 41-72). Springer Science.
19. Lee, B. U. (2011). Life Comes from the Air: A Short Review on Bioaerosol Control. *Aerosol and Air Quality Research*, 921–927.
20. Mac Faddin, J. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica.* México: Editorial Médica Panamericana.
21. Mandal, J., & Brandl, H. (2011). Bioaerosols in Indoor Environment - A Review with Special Reference to Residential and Occupational Locations. *The Open Environmental & Biological Monitoring Journal*, 83-96.
22. Morris, K. J. (1995). Chapter 11 Modern Microscopic Methods Of Bioaerosol Analysis. En C. S. Cox, & C. M. Wathes, *Bioaerosols Handbook* (págs. 2-37). CRC Press.
23. NIOSH. (1998). NIOSH 0800 Biaerosols Sampling. En M. K. Lonon, *NIOSH Manual of Analytical Methods* (pág. 1). USA: John Wiley & Sons, Inc.
24. Ooi, W. H. (1997). *Laboratory Manual: Microbiology 6th Edition.* Houston: Royal Publishing.
25. Peccia, J., & Hernandez , M. (2006). Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of

microorganisms into aerosol science: A review. *Atmospheric Environment 40*, 3941 – 3961.
26. Pratts, G. (2005). *Microbiología Clínica.* México: Panamericana.
27. Prescott, L., Harley, J., & Klien, D. (2008). Microbiology 7th Edition. México: Mc Graw-Hill.
28. Sánchez-Monedero, M., Roig, A., Cayuela, M., & Stentiford, E. (2006). Emisión de bioaerosoles asociada a la gestión de residuos orgánicos. *Ingeniería 10-1*, 39-47.
29. Schwarz, S. C., Doublet, B., & Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews - Federation of European Microbiological Societies*, 519-542.
30. Silva, T., Jean, D., Vidmantas, U., & Grinshpun, S. (1996). Comparison of Methods for Detection and Enumeration of Airborne Microorganisms Collected by Liquid Impingement. *Applied And Environmental Microbiology*, 2264–2272.
31. Srikanth, P., Sudharsanam, S., & Steinberg, R. (2008). Bio-Aerosols In Indoor Environment: Composition, Health Effects And Analysis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 302-312.
32. Stetzenbach, L. D., Buttner, M., & Cruz, P. (2004). Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Current Opinion in Biotechnology - Environmental Biotechnology - Elsevier*, 170-174.
33. Tilley, I. R. (1997). Bioaerosols: A Survey. *DSTO Aeronautical and Maritime Research Laboratory*, 1-20.
34. TULAS. (2011). Norma de Calidad del Aire Libro VI Anexo 4. *TULAS-Presidencia de la República de Ecuador*, 402-415.
35. Vélez, A., & Camargo, Y. (2008). Comportamiento Aerodinámico Y Viabilidad De Las Partículas Biológicas. *RE´TAKVN - Colombia*, 44-56.
36. Zaror, C. (2000). *Introducción a la Ingeniería Ambiental para la Industria de Procesos.* Chile: Universidad de Concepción.